



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo

Ciclo XXIII

TITOLO TESI

STUDIO DEL RITARDO MENTALE ASPECIFICO LEGATO AL
CROMOSOMA X

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

MED/03 GENETICA MEDICA

Presentata da: Marianna Serrenti

Coordinatore Dottorato Prof. Renzo Galanello

Relatore Prof.ssa Maria Antonietta Melis

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

INDICE:

Introduzione.....pag. 3-11

Obiettivo dello studio.....pag. 12-13

Materiali e metodi.....pag. 14-23

Risultatipag. 24-35

Discussione.....pag. 36-38

Bibliografia.....pag. 39-42

INTRODUZIONE

Il ritardo mentale è una condizione di interrotto o incompleto sviluppo psichico, caratterizzato soprattutto da compromissione delle abilità cognitive, linguistiche, motorie, affettive e sociali che si manifestano durante il periodo evolutivo e che contribuiscono al livello globale di intelligenza.

L'incidenza del 3% nella popolazione umana, ne fa una patologia ad alta rilevanza clinica per l'impatto che essa ha sulla restante popolazione.

Il ritardo mentale dipende da difetti della formazione e della funzionalità delle sinapsi, le strutture di “ comunicazione “ tra cellule nervose. Perciò deficit nella formazione di queste strutture possono causare disturbi quali l'autismo, ritardo mentale e molti disturbi degenerativi.

La caratteristica fondamentale del ritardo mentale è un funzionamento intellettivo generale significativamente al di sotto della media ($Q.I. < 70$) che è accompagnato da significative limitazioni nel funzionamento adattivo in almeno una delle seguenti aree:

- Comunicazione
- Cura della persona
- Vita in famiglia
- Capacità sociali / interpersonali
- Uso delle risorse della comunità
- Autodeterminazione
- Capacità di funzionamento scolastico

- Lavoro
- Tempo libero
- Salute e sicurezza.

Si manifesta nell'età dello sviluppo prima dei 18 anni.

In base al quoziente intellettivo si possono distinguere vari sottotipi di ritardo mentale:

- Q.I. tra 50-55 e 70 corrisponde ad un ritardo mentale LIEVE (85% dei casi)
- Q.I. tra 35-40 e 50-55 corrisponde ad un ritardo mentale MODERATO (10% dei casi)
- Q.I. tra 20-25 e 35-40 corrisponde ad un ritardo mentale GRAVE (3-4% dei casi)
- Q.I. inferiore a 20-25 corrisponde ad un ritardo mentale GRAVISSIMO O PROFONDO (1-2% dei casi) .

RITARDO MENTALE LIEVE

Si osservano frequentemente difficoltà dell'apprendimento in ambito scolastico, mentre nell'età adulta raggiungono un'autonomia lavorativa, relazioni sociali soddisfacenti, e risultano in grado di contribuire al benessere della società.

RITARDO MENTALE MODERATO

Si associa a marcati ritardi dello sviluppo durante l'infanzia, pur potendo sviluppare un certo grado di indipendenza nella cura di sé, discrete abilità scolastiche e capacità comunicative. Per essere inseriti in ambito sociale e lavorativo necessitano abitualmente di un supporto.

RITARDO MENTALE GRAVE

E' quasi sempre indispensabile un supporto continuo.

RITARDO MENTALE GRAVISSIMO

Vi è una grave limitazione nella cura di sé, nella comunicazione e nella mobilità.

CAUSE

Il ritardo mentale può essere causato da fattori genetici e fattori ambientali che agiscono sullo sviluppo e sul funzionamento del sistema nervoso centrale in età prenatale, perinatale e postnatale.

I fattori genetici includono aneuploidie cromosomiche, anomalie strutturali cromosomiche, disordini genomici e malattie monogeniche.

Tali fattori incidono in circa il 30% dei ritardi moderati, mentre i fattori ambientali (malnutrizione, deprivazione culturale) giocano un ruolo importante nella patogenesi del ritardo mentale lieve.

Il ritardo mentale dovuto a fattori genetici può essere legato agli autosomi o al cromosoma X (XLMR).

RITARDO MENTALE X-LINKED (XLMR)

I difetti genetici X-linked sono stati a lungo considerati importanti cause del ritardo mentale, sulla base della constatazione che il ritardo mentale è significativamente più comune nei maschi che nelle femmine (1 su 600 maschi). Osservazioni cliniche e studi di linkage in famiglie hanno rivelato che il ritardo mentale X-linked (XLMR) è una condizione molto eterogenea.

La sindrome dell'X-fragile è la forma più comune rappresentando circa il 15% di tutti i casi di XLMR.

Finora sono stati identificati 90 geni le cui mutazioni causano XLMR.

I ritardi mentali X-linked sono generalmente suddivisi in forme sindromiche (MRXS) e forme non sindromiche (MRX) a seconda che si evidenzino o no ulteriori anomalie in aggiunta al ritardo mentale. Esse sono diagnosticate in base a visite mediche, indagini di laboratorio e fotografie cerebrali. Circa due terzi dei casi di XLMR si pensa siano non sindromici; sinora sono stati descritti circa 140 MRXS, in 66 dei quali sono stati identificati i difetti genetici che li causavano e in circa altri 50 casi il difetto di base è stato mappato in una specifica regione del cromosoma X. Al contrario, per MRX, meno del 50% dei geni che causano il difetto sono stati identificati.

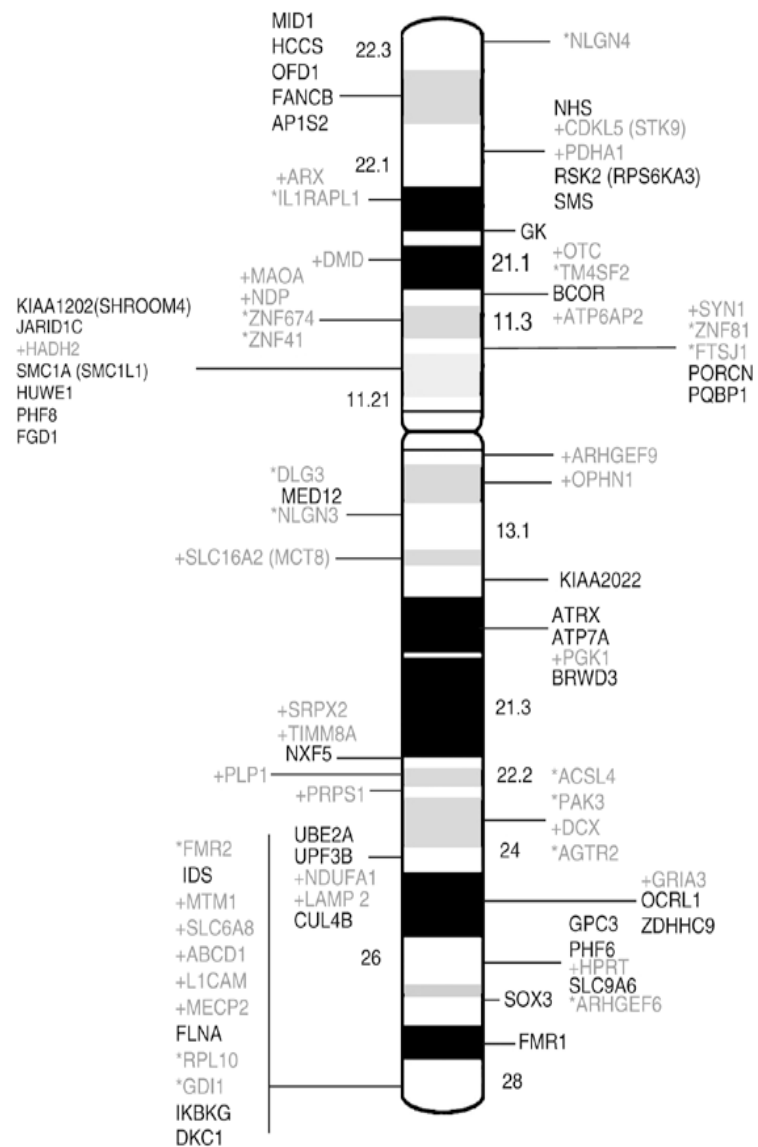
L'incidenza dell' MRX nei maschi è di circa 1/900, pari ai due terzi dei casi familiari di ritardo mentale legato all' X. In considerazione del fatto che il sintomo prevalente è il ritardo mentale e gli esami di routine non evidenziano altri segni clinici caratteristici, fino ad oggi la diagnosi dell' MRX viene considerata solo in base alla ricorrenza familiare legata all'X. Nei maschi che presentano ritardo mentale isolato permanente a eziologia non nota devono essere eseguite indagini accurate per verificare la sua eventuale ricorrenza familiare. Tuttavia, la storia naturale, la gravità e il quadro clinico dell' MRX spesso variano anche

tra i fratelli che appartengono alla stessa famiglia. Inoltre, possono essere osservati nella famiglia segni fisici minori (ipotonia neonatale, iperriflessia, microcefalia moderata, statura leggermente bassa, rare crisi epilettiche o un arresto secondario del linguaggio), che, anche se apparentemente irrilevanti, possono costituire segni evocatori. Sono stati identificati diciassette geni-malattia dell' MRX. La maggior parte delle proteine codificate da questi geni è implicata, direttamente o attraverso la loro funzione regolativa, nello sviluppo delle cellule neurali o nella comunicazione sinaptica tra queste cellule. Queste proteine influenzano l'apprendimento e/o la memoria. Nei pazienti affetti da MRX, la funzione e lo sviluppo del cervello e/o la plasticità neuronale sono alterati. Inoltre, in alcune famiglie affette da MRX, sono state identificate mutazioni geniche specifiche. Tuttavia devono essere individuati altri geni, in quanto il gene-malattia non è ancora stato identificato nella metà di queste famiglie. L'identificazione di questi geni permette oggi di effettuare studi clinici basati sull'approccio gene per gene. L'approccio multidisciplinare basato su strumenti neurologici, psicologici e psichiatrici e sull'imaging ad alta definizione ha permesso di dimostrare la presenza di alcuni segni caratteristici, come una presunta anomalia morfologica del verme cerebellare (gene OPHN1) o disturbi molto specifici del movimento delle mani (gene ARX). In questo modo, alcune forme in precedenza classificate come "non specifiche" (MRX)

hanno dimostrato con il tempo di avere una specificità gene-dipendente (MRXS). E' possibile che in futuro si possa identificare un fenotipo specifico per ogni gene implicato nell' MRX, tale da consentire l'implementazione di un protocollo di analisi economico e efficiente destinato ai maschi affetti da ritardo mentale. L'individuazione dei diversi segni potrebbe orientare la diagnosi verso una forma o verso un'altra di MRX e dimostrare la trasmissione attraverso il cromosoma X, anche se ne è affetto un solo soggetto.

La figura [Fig.1] riporta la localizzazione dei vari geni XLMR noti, distribuiti lungo tutto il cromosoma X, con una densità particolarmente alta nelle regioni Xq28 e Xp11. Considerato che il numero totale dei geni del cromosoma X è pari a circa 900, la frequenza di geni responsabili di XLMR è pari almeno al 10 % del totale. Tale alta frequenza ha portato a ipotizzare che sul cromosoma X si sia accumulato un numero di geni importanti per il funzionamento intellettuale, anche se le cause di tale accumulo non sono state chiarite e rimangono materia di speculazione.

La ricerca genetica va verso l'identificazione di tutti i geni XLMR e ciò sarà un importante risultato, sia per ragioni cliniche sia per aumentare la nostra conoscenza sulle funzioni del cervello, identificando i geni che sono coinvolti nella sua fisiopatologia.



[Fig.1]

Nella figura sono indicati: in nero i geni responsabili di una vera e propria sindrome (RM accompagnato da malformazioni in diversi organi e apparati), in grigio preceduti dal segno +, i geni che oltre al RM causano una patologia neuromuscolare, mentre in grigio preceduti da un * sono indicati i geni che si associano a RM isolato (XLMR non specifico).

OBIETTIVO

L'obiettivo di questo studio è la definizione del difetto genetico responsabile del Ritardo Mentale non sindromico legato al cromosoma X in una famiglia sarda, attraverso l'utilizzo di diverse strategie d'analisi del DNA.

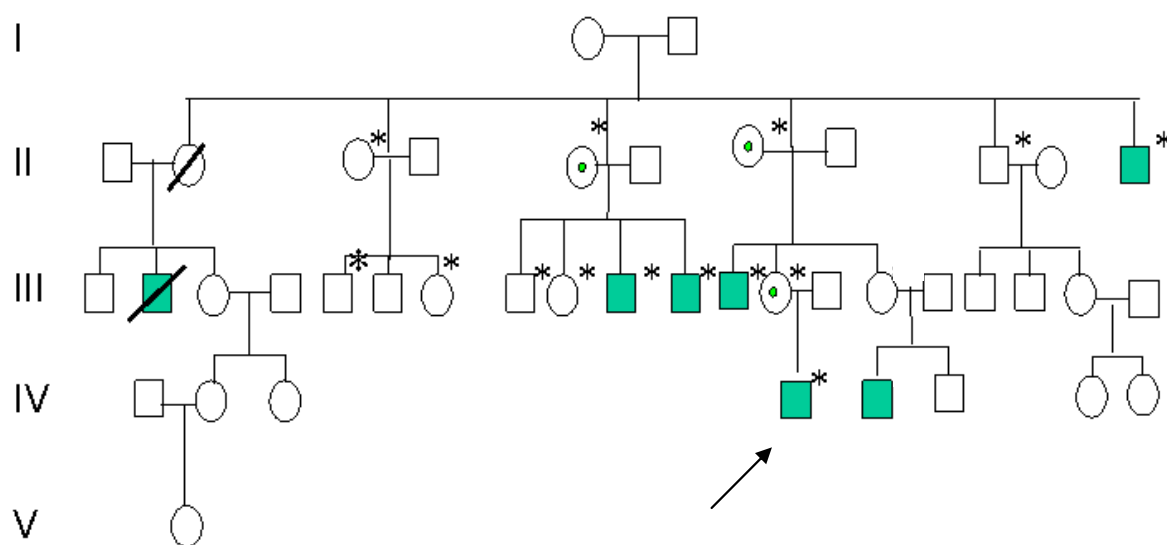
MATERIALI

e

METODI

FAMIGLIA

La famiglia di origine sarda, è composta da 40 soggetti distribuiti in quattro generazioni, 7 dei quali affetti da ritardo mentale. L'analisi dell'albero genealogico suggerisce una trasmissione del tratto legata all'X recessiva. Sono stati analizzati 14 soggetti, 5 dei quali affetti da ritardo mentale X-linked. Nei soggetti affetti è stata esclusa la sindrome dell'X fragile che è il primo test diagnostico da effettuare nei casi di ritardo mentale X-linked.



[Fig. 2]

Albero genealogico della famiglia.

I soggetti esaminati sono indicati con l'asterisco, i soggetti affetti sono indicati in verde

ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA genomico da analizzare è stato estratto da campioni di sangue periferico utilizzando metodi standard.

MLPA

(Multiplex Ligation Probe Amplification)

MLPA è una tecnica per individuare aberrazioni del numero di copie di sequenze di DNA genomico che si basa sull'ibridazione di più sonde specifiche amplificate contemporaneamente in un'unica PCR.

- *Ricerca delle delezioni / duplicazioni nei geni MRX*

Lo studio delle delezioni / duplicazioni dei geni MRX è stato effettuato mediante analisi MLPA utilizzando la *SALSA probemix P106-B1 MRX MLPA* (Tab.1) che permette lo studio del numero di copie di alcuni geni del cromosoma X, implicati nel ritardo mentale X-linked non specifico.

Il Kit MLPA P106-B1 MRX include le probe per 14 differenti geni MRX:

PQBP1, TM4SF2, ARX, IL1RAPL1, RPS6KA3, OPHN1, FACL4, DCX, PAK3, ARHGEF6, FMR1, FMR2, GDI1, SLC6A8.

Tab.1

SALSA MLPA P106 MRX probemix

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Gene | Chromosomal position |
|-------------|---------------------|-----------------|-------------------------|
| 130 | 1690-L0423 | Reference probe | Xq11.2 |
| 136 | 2916-L4199 | GDI1 | Xq28 |
| 142 | 2928-L3720 | FMR1 | Xq27.3 |
| 148 | 2935-L2326 | FA2L4 | Xq22.3 |
| 154 | 3511-L4202 | FMR2 | Xq28 |
| 160 | 2903-L2297 | TMSF2 | Xq11.4 |
| 166 | 2927-L3721 | FMR1 | Xq27.3 |
| 172 | 2901-L2295 | ARHGEF6 | Xq26 |
| 178 | 2907-L2301 | RPS6KA3 | Xq22.2 |
| 184 | 2155-L1607 | FA2L4 | Xq22.3 |
| 190 | 3514-L2291 | ARX | Xq22.1 |
| 202 | 2903-L4460 | ARHGEF6 | Xq26 |
| 211 | 4123-L3480 | DCX | Xq23 |
| 220 | 2898-L4200 | ARX | Xq22.1 |
| 229 | 2922-L4201 | IL1RAPL1 | Xq22.1 |
| 238 | 3516-L2322 | FMR2 | Xq28 |
| 247 | 3512-L1606 | FA2L4 | Xq22.3 |
| 256 | 2933-L2324 | FMR2 | Xq28 |
| 265* | 2904-L2298 | TMSF2 | Xq11.4 |
| 274 | 4124-L3481 | DCX | Xq23 |
| 283 | 0493-L0369 | FMR2 | Xq28 |
| 292 | 2920-L2314 | IL1RAPL1 | Xq22.1 |
| 301 | 1876-L1445 | SLC6A8 | Xq28.1 |
| 310 | 2918-L2878 | PQBP1 | Xp11.23 |
| 319 | 4121-L3478 | DCX | Xq23 |
| 328 | 2921-L2315 | IL1RAPL1 | Xq22.1 |
| 337 | 2932-L2323 | FMR2 | Xq28 |
| 346 | 3719-L2293 | ARHGEF6 | Xq26 |
| 355 | 2925-L2319 | Agt2 | Xq24 |
| 364 | 2906-L2300 | RPS6KA3 | Xq22.2 |
| 373 | 2912-L2306 | OPHN1 | Xq12 |
| 378 | 2917-L2311 | GDI1 | Xq28 |
| 385 | 2908-L3178 | PAK3 | Xq23 |
| 391 | 3520-L2313 | PQBP1 | Xp11.23 |
| 400 | 3521-L2304 | PAK3 | Xq23 |
| 409 | 2913-L2307 | OPHN1 | Xq12 |
| 418 | 2909-L2303 | PAK3 | Xq23 |
| 427 | 2923-L2317 | IL1RAPL1 | Xq22.1 |
| 430 | 2914-L2308 | OPHN1 | Xq12 |
| 445 | 3720-L2294 | ARHGEF6 | Xq26 |
| 454 | 3762-L2299 | RPS6KA3 | Xq22.2 |
| 463 | 1872-L1441 | SLC6A8 | Xq28.1 |
| 472 | 2915-L2309 | OPHN1 | Xq12 |
| 481 | 2911-L2305 | PAK3 | Xq23 |

- *Ricerca delle delezioni / duplicazioni nei telomeri*

Il ritardo mentale è causato, nel 3-8% dei casi, da una variazione del numero di copie delle regioni subtelomeriche. La presenza di delezioni/duplicazioni nelle regioni subtelomeriche è stata valutata utilizzando la *SALSA MLPA Kit P070-B1* (*Tab.2*) e la *SALSA MLPA Kit P036-E1* (*Tab.3*) che contengono una probe per ogni regione subtelomerica e sono disegnati per la ricerca di delezioni/duplicazioni di ogni regione subtelomerica.

Table 2. SALSA MLPA P070-B1 Human Telomere-5 probemix*

| Length (nt) | Chromosomal position | Gene detected | SALSA MLPA probe | MapView build 36 position |
|-------------|----------------------|----------------------|------------------|----------------------------------|
| 132 | 1q | SH3BP5L (KIAA1720) | 04084-L03605 | 01-247.08 |
| 139 | 2q | ATG4B (=APG4B) | 02781-L03169 | 02-242.25 |
| 145 | 3q | KIAA0226 | 02690-L02842 | 03-198.88 |
| 152 | 4q | FRG1 | 02691-L02843 | 04-191.10 |
| 160 | 5q | GNB2L1 | 02790-L02232 | 05-180.60 |
| 166 | 6q | TBP | 02694-L02844 | 06-170.71 |
| 172 | 7q | VIPR2 | 02793-L03167 | 07-158.63 |
| 179 | 8q | RECQL4 | 02695-L00610 | 08-145.71 |
| 186 | 9q | EHMT1 | 02792-L02846 | 09-139.78 |
| 193 | 10q | ECHS1 | 02696-L02847 | 10-135.03 |
| 202 | 11q | IGSF9B (=KIAA1030) | 02697-L02848 | 11-133.29 |
| 211 | 12q | ZNF10 | 02698-L02849 | 12-132.24 |
| 218 | 13q | CDC16 | 02698-L00753 | 13-114.03 |
| 226 | 14q | MTA1 | 02699-L02850 | 14-104.99 |
| 233 | 15q | TM2D3 (=FLJ22604) | 02701-L02851 | 15-100.01 |
| 241 | 16q | GAS8 (=GAS11) | 02702-L00734 | 16-088.64 |
| 250 | 17q | SECTM1 | 02703-L03169 | 17-077.87 |
| 258 | 18q | CTDP1 | 02704-L03607 | 18-075.58 |
| 265 | 19q | BC-2 | 02705-L02853 | 19-063.76 |
| 274 | 20q | UCKL1 (=FLJ20517) | 02706-L00642 | 20-062.05 |
| 281 | 21q | S100B | 02587-L02854 | 21-046.85 |
| 290 | 22q | ARSA | 02707-L00661 | 22-049.41 |
| 298 | X/Yq (PAR2) | VAMP7 (=SYBL1) | 02708-L02855 | X-154.82 + Y-057.68 (PAR region) |
| 306 | 1p | TNFRSF18 | 02270-L01762 | 01-001.13 |
| 315 | 2p | ACP1 | 02709-L02856 | 02-000.27 |
| 323 | 3p | CHL1 | 02896-L02363 | 03-000.34 |
| 329 * | 4p | PIGG | 14440-L16146 | 04-000.51 |
| 337 | 5p | CCDC127 (=LOC133957) | 02791-L02233 | 05-000.26 |
| 346 | 6p | IRF4 | 04077-L03462 | 06-000.34 |
| 355 | 7p | UNC84A | 02780-L02857 | 07-000.84 |
| 362 | 8p | FBXO25 | 02715-L00973 | 08-000.40 |
| 370 | 9p | DOCK8 (=FLJ00026) | 02716-L00688 | 09-000.38 |
| 379 † | 10p | ZMYND11 (=BS69) | 05180-L16343 | 10-000.22 |
| 387 | 11p | BET1L | 02784-L02226 | 11-000.20 |
| 393 | 12p | JARID1A (=RBBP2) | 02787-L02229 | 12-000.29 |
| 402 + | "13p" | PSPC1 | 02717-L03608 | 13-019.25 (Acrocentric) |
| 409 + | "14p" | ADPRTL2 | 02718-L00732 | 14-019.90 (Acrocentric) |
| 418 + | "15p" | NDN | 04026-L01542 | 15-021.48 (Acrocentric) |
| 427 | 16p | DECR2 | 02720-L00648 | 16-000.40 |
| 436 | 17p | RPH3AL | 04081-L03465 | 17-000.18 |
| 444 | 18p | THOC1 | 02789-L02231 | 18-000.20 |
| 450 | 19p | PPAP2C | 03501-L02899 | 19-000.23 |
| 459 | 20p | ZCCHC3 (=FLJ22115) | 02723-L00641 | 20-000.23 |
| 466 + | "21p" | STCH | 02724-L00334 | 21-014.68 (Acrocentric) |
| 478 + ‡ | "22p" | IL17RA | 02725-L16344 | 22-015.96 (Acrocentric) |
| 484 ‡ | X/Yp (PAR1) | SHOX | 03714-L16345 | X/Y-000.52 (PAR region) |

Tab.3 SALSA MLPA P036-E1 Human Telomere-3 probemix *

| Length (nt) | Chromosomal position | Gene detected | SALSA MLPA probe | MapView build 36 position |
|-------------|----------------------|----------------|------------------|---|
| 130 6 | 1p | TNFRSF4 | 2269-L01761 | 01-001.14 |
| 137 | 2p | ACP1 | 2274-L08758 | 02-000.25 |
| 144 | 3p | CHL1 | 1721-L01329 | 03-000.34 |
| 151 | 4p | FLJ20265 | 2005-L02047 | 04-000.50 |
| 158 | 5p | PDCD6 | 1723-L01327 | 05-000.37 |
| 165 | 6p | IRF4 | 1724-L02048 | 06-000.34 |
| 172 | 7p | CENTA1 | 2275-L02049 | 07-000.93 |
| 179 | 8p | FBXO25 | 2397-L01845 | 08-000.40 |
| 186 | 9p | DMRT1 | 1727-L02050 | 09-000.84 |
| 194 | 10p | KIAA0934 | 2277-L01768 | 10-000.48 |
| 202 | 11p | RIC-8 | 3315-L02733 | 11-000.20 |
| 208 | 12p | SLC6A12 | 2276-L01767 | 12-000.17 |
| 218 + | "13p" | PSPC1 | 2399-L01847 | 13-019.24 (Acrocentric) |
| 226 + | "14p" | HEI10 | 1732-L01318 | 14-019.86 (Acrocentric) |
| 234 + | "15p" | MKRN3 | 7291-L08858 | 15-021.36 (Acrocentric) |
| 242 | 16p | POLR3K | 1734-L01316 | 16-000.04 |
| 250 | 17p | RPH3AL | 1735-L01315 | 17-000.17 |
| 258 | 18p | USP14 | 1736-L02051 | 18-000.19 |
| 266 | 19p | CDC34 | 1737-L01313 | 19-000.49 |
| 274 | 20p | SOX12 | 2396-L01844 | 20-000.26 |
| 282 + | "21p" | RBM11 | 1739-L01311 | 21-014.51 (Acrocentric) |
| 290 + | "22p" | BID | 1740-L01310 | 22-016.61 (Acrocentric) |
| 298 | X/Yp (PAR1) | SHOX | 1148-L01331 | X/Y-000.52 (PAR region) |
| 306 | 1q | KIAA1720 | 2392-L02149 | 01-247.08 (0.2 Mb from telomere) |
| 314 | 2q | CAPN10 | 1742-L01308 | 02-241.18 (1.6 Mb from telomere) |
| 322 | 3q | BDH | 2013-L02052 | 03-198.76 (0.7 Mb from telomere) |
| 330 6 | 4q | TRIML2 | 12050-L11446 | 04-189.26 (2.0 Mb from telomere) |
| 338 | 5q | GNB2L1 | 3319-L02737 | 05-180.60 (0.2 Mb from telomere) |
| 346 | 6q | PSMB1 | 1746-L01304 | 06-170.69 (0.5 Mb from telomere) |
| 354 | 7q | VIPR2 | 1747-L01303 | 07-158.60 (0.3 Mb from telomere) |
| 362 | 8q | KIAA0150 | 1748-L01302 | 08-144.69 (1.6 Mb from telomere) |
| 370 | 9q | EHMT1 | 8205-L08170 | 09-139.83 (0.2 Mb from telomere) |
| 378 | 10q | PAO | 9142-L09953 | 10-135.05 (0.2 Mb from telomere) |
| 386 | 11q | KIAA0056 | 1751-L01299 | 11-133.60 (1.2 Mb from telomere) |
| 394 | 12q | ZNF10 | 2687-L02154 | 12-132.24 (0.2 Mb from telomere) |
| 402 | 13q | FZ | 1753-L01297 | 13-112.82 (1.3 Mb from telomere) |
| 410 | 14q | MTA1 | 2778-L02201 | 14-105.00 (1.3 Mb from telomere) |
| 418 | 15q | ALDH1A3 | 1755-L01295 | 15-099.26 (1.0 Mb from telomere) |
| 426 | 16q | GAS11 / GAS8 | 3201-L02669 | 16-088.63 (0.2 Mb from telomere) |
| 434 | 17q | TBCD | 1757-L01293 | 17-078.45 (0.5 Mb from telomere) |
| 442 | 18q | FLJ21172 | 1758-L01292 | 18-075.90 (0.2 Mb from telomere) |
| 450 | 19q | BC-2 | 9143-L10626 | 19-063.75 (0.9 Mb from telomere) |
| 458 | 20q | OPRL1 | 2688-L02864 | 20-062.19 (0.2 Mb from telomere) |
| 466 | 21q | HMT1 | 2586-L02059 | 21-046.89 (0.1 Mb from telomere) |
| 474 | 22q | RABL2B | 1762-L08761 | 22-049.55 (0.1 Mb from telomere) |
| 482 | X/Yq (PAR2) | VAMP7 (=SYBL1) | 1763-L02150 | X/Y-154.78 (PAR region; 0.1 Mb from tel.) |

GENOTIPIZZAZIONE CON MICROSATELLITI

La famiglia oggetto dello studio risulta essere sufficientemente estesa per avere un valore statistico significativo, per cui su di essa è stato effettuato uno studio di linkage.

Data l'ereditarietà X-linked della famiglia l'analisi di linkage è stata effettuata solo per il cromosoma X, utilizzando l'ABI-PRISM Linkage Mapping set (Perkin-Elmer) costituito da 18 marcatori, 7 localizzati sul braccio corto (Xp) e 11 sul braccio lungo (Xq), che definiscono una mappa con una risoluzione di circa 10 Mb dell' intero cromosoma X.

Per definire ulteriormente la regione candidata (con un LOD SCORE a due punti > 2) abbiamo selezionato dalla banca dati Geneloc i seguenti marcatori localizzati alla distanza di 1 cM: DXS8105, AF137Xg9, DXS1223, DXS7103, DXS7104. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica. L'analisi è stata effettuata assumendo che la malattia sia X-linked con penetranza completa. Gli alleli dei singoli marcatori sono stati considerati di frequenza uguale. L'analisi a due punti è stata effettuata utilizzando ILINK e MLINK routine di FASTLINK v.4.0p. Dalla genotipizzazione dei marcatori scelti abbiamo costruito gli aplotipi. L'analisi degli aplotipi è stata effettuata utilizzando il programma Cyrillic 2 e GENEHUNTER v.2.0. (23, 24)

ANALISI BIOINFORMATICA

La ricerca bioinformatica dei geni la cui funzione può essere associata alla fisiologia dello sviluppo o del funzionamento del sistema nervoso è stata effettuata consultando le informazioni disponibili sul database GENELOC e NCBI e sulle altre banche dati collegate, con l'obiettivo di identificare un gene che, per omologia di struttura o di funzione con geni che codificano per proteine che svolgano una funzione nel sistema nervoso, possa essere ritenuto responsabile del ritardo mentale nella famiglia in esame.

SEQUENZIAMENTO DEI GENI CANDIDATI

I geni selezionati dall'analisi bioinformatica sono stati esaminati attraverso il sequenziamento automatico utilizzando il sequenziatore ABI Prism 3130.

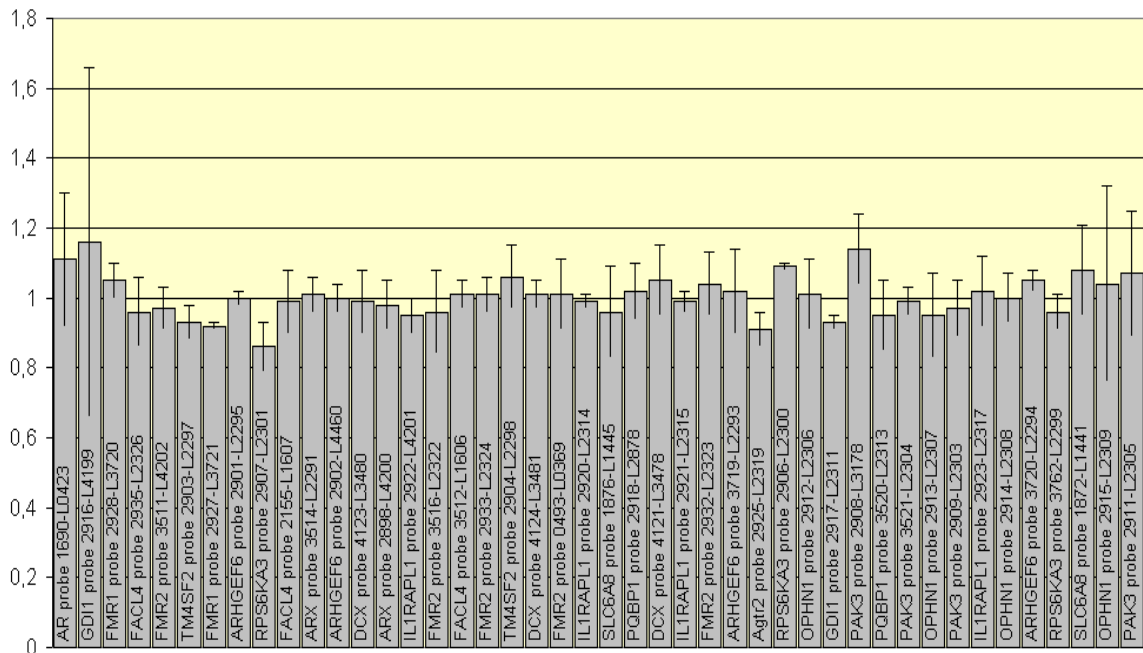
I dati sono stati elaborati con il software Sequencing analysis versione 5.2 (Applied Biosystems).

RISULTATI

MLPA

- *Ricerca delle delezioni / duplicazioni nei geni MRX*

L'analisi molecolare effettuata sul probando mediante MLPA con probe-mix P106 MRX, non ha messo in evidenza alcuna duplicazione o delezione (Fig.7).

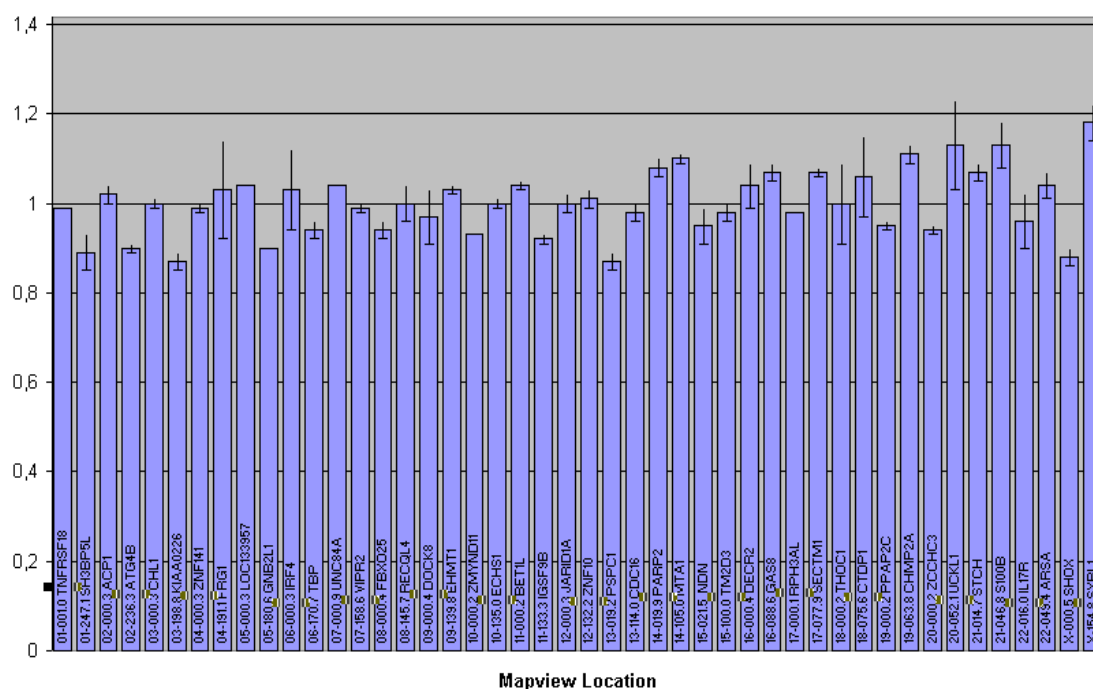


[Fig. 7]

Istogramma ottenuto con la probe-mix P106 MRX MLPA effettuata sul probando.

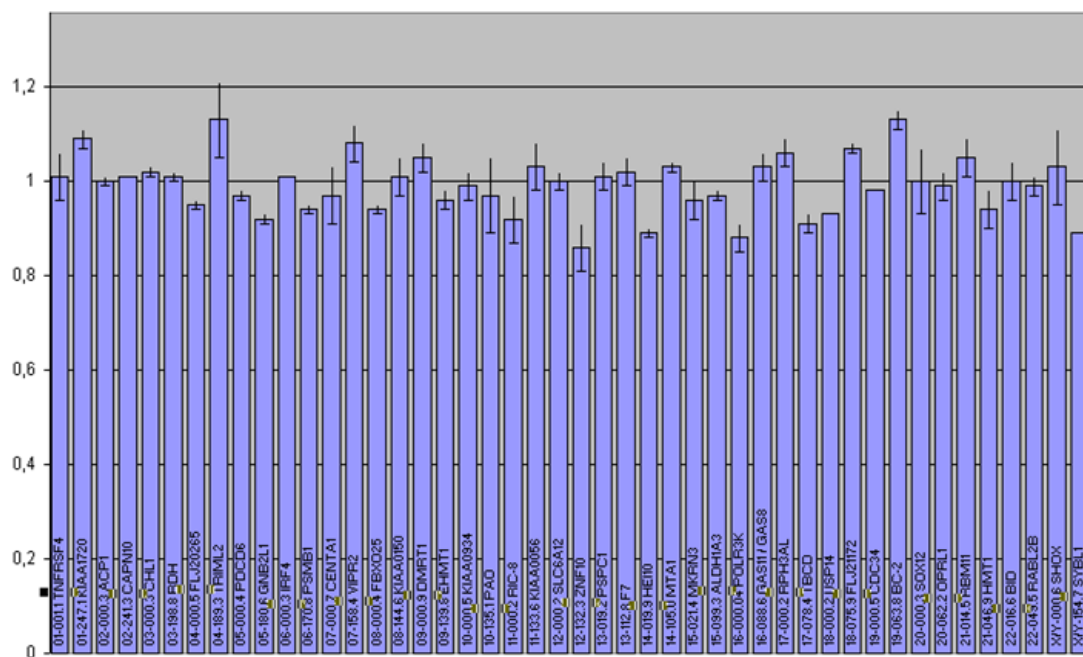
- *Ricerca delle delezioni / duplicazioni nei telomeri*

L'analisi molecolare effettuata sul probando mediante MLPA con le probe-mix P070-B1 (Fig.8) e P036-E1 (Fig. 9), non ha messo in evidenza alcuna duplicazione o delezione.



[Fig. 8]

Istogramma ottenuto con la probe-mix P070-B1 MRX MLPA effettuata sul probando.



[Fig. 9]

Istogramma ottenuto con la probe-mix P036-E1 MRX MLPA effettuata sul probando

GENOTIPIZZAZIONE CON MICROSATELLITI

L'analisi statistica dei dati ottenuti dall'analisi di linkage con Linkage Mapping Set ha mostrato un valore di Lod Score di 2.53 per il marcatore DXS8051 situato nella regione Xp22.31 a circa 9,4 Mb dall'estremità telomerica del braccio corto del cromosoma X (tab 4). Lo studio della regione Xp22.31 effettuata analizzando 5 marcatori microsatelliti situati in prossimità del marcatore DXS8051 ha confermato l'associazione della regione compresa tra il marcatore DXS1060 e DXS987 con la malattia (tab 5). L'analisi statistica multipoint ha messo in evidenza un LOD SCORE di 2,83 in prossimità del marcatore DXS7103 (Fig 10).

Gli aplotipi ottenuti per ciascun soggetto esaminato sono mostrati in Fig11.

| Marker | Theta | | | | | | |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0,0 | 0,01 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
| Xp | | | | | | | |
| DXS1060 | 1,72 | 1,70 | 1,61 | 1,49 | 1,21 | 0,87 | 0,47 |
| DXS9051 | 2,53 | 2,49 | 2,31 | 2,08 | 1,59 | 1,06 | 0,51 |
| DXS987 | - inf. | - 0,40 | 0,20 | 0,37 | 0,42 | 0,34 | 0,20 |
| DXS1226 | 1,42 | 1,40 | 1,32 | 1,22 | 1,01 | 0,75 | 0,41 |
| DXS1214 | - inf. | - 4,68 | - 2,62 | - 1,76 | - 0,94 | - 0,50 | - 0,21 |
| DXS1058 | - inf. | - 0,10 | 0,48 | 0,63 | 0,62 | 0,48 | 0,28 |
| DXS993 | - inf. | 0,19 | 0,74 | 0,84 | 0,75 | 0,55 | 0,29 |
| Xq | | | | | | | |
| DXS991 | - inf. | - 0,10 | 0,50 | 0,66 | 0,67 | 0,53 | 0,30 |
| DXS986 | - inf. | - 0,70 | - 0,10 | 0,07 | 0,14 | 0,11 | 0,06 |
| DXS990 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,15 | 0,12 | 0,07 |
| DXS1106 | 1,42 | 1,40 | 1,32 | 1,22 | 1,01 | 0,75 | 0,41 |
| DXS9056 | 1,15 | 1,14 | 1,07 | 0,99 | 0,82 | 0,60 | 0,33 |
| DXS1001 | 1,42 | 1,40 | 1,32 | 1,22 | 1,01 | 0,75 | 0,41 |
| DXS1047 | | | | | | | |
| DXS1227 | - inf. | - 3,02 | - 1,06 | - 0,32 | 0,21 | 0,33 | 0,24 |
| DXS9043 | - inf. | - 2,68 | - 1,30 | - 0,74 | - 0,24 | - 0,03 | 0,04 |
| DXS9091 | - inf. | - 0,82 | - 0,17 | 0,07 | 0,24 | 0,24 | 0,16 |
| DXS1073 | - inf. | - 2,56 | - 1,22 | - 0,69 | - 0,24 | - 0,07 | 0,00 |

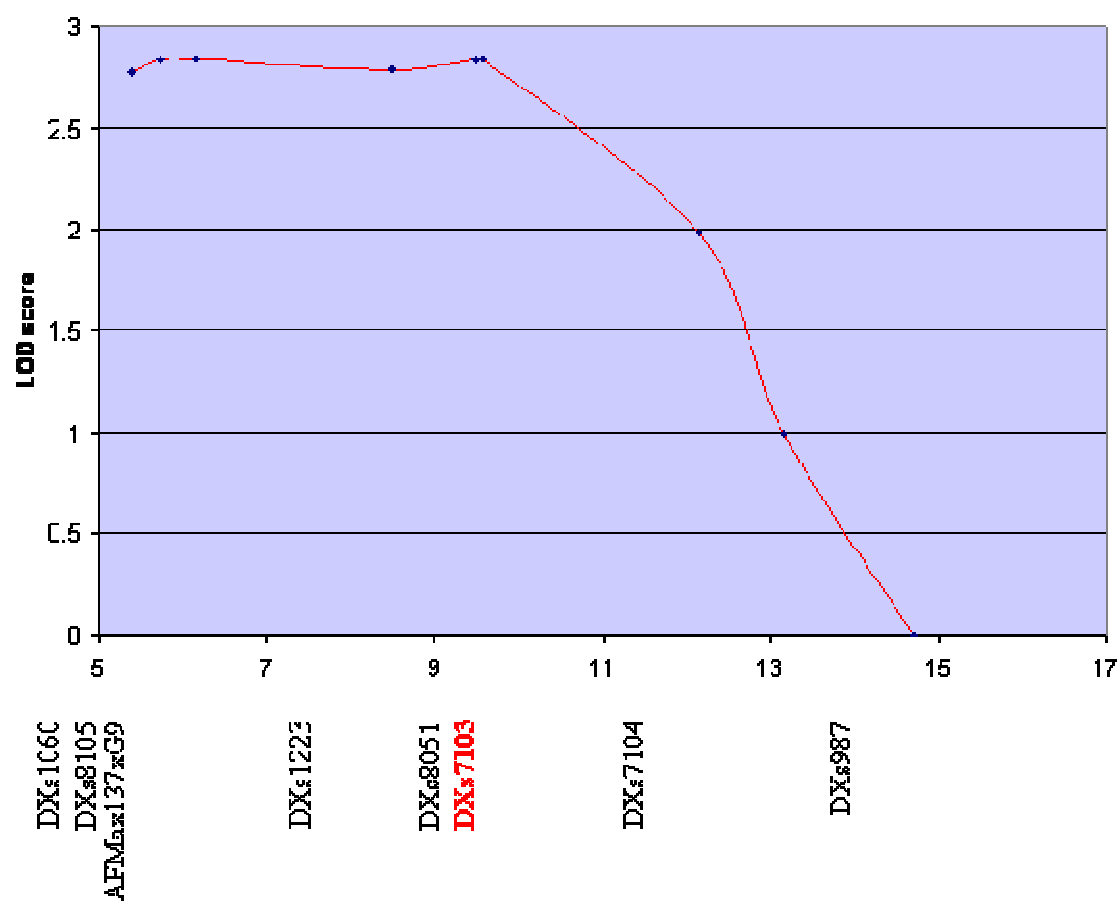
[Tab. 4]

Valori di Lod Score calcolati per ognuno dei 18 marcatori microsatelliti utilizzati.

| Marker | Theta | | | | | | |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0,0 | 0,01 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
| Xp | | | | | | | |
| DXS8105 | 2,53 | 2,49 | 2,31 | 2,08 | 1,57 | 1,03 | 0,47 |
| AF137Xg9 | 2,53 | 2,49 | 2,31 | 2,08 | 1,57 | 1,03 | 0,47 |
| DXS1223 | 1,56 | 1,53 | 1,45 | 1,33 | 1,08 | 0,78 | 0,42 |
| DXS8051 | 2,53 | 2,49 | 2,31 | 2,08 | 1,59 | 1,06 | 0,51 |
| DXS7103 | 2,83 | 2,79 | 2,59 | 2,34 | 1,79 | 1,19 | 0,56 |
| DXS7104 | 2,53 | 2,49 | 2,3 | 2,06 | 1,55 | 1 | 0,45 |

[Tab. 5]

Valori di Lod Score calcolati per ognuno dei 5 marcatori microsatelliti utilizzati.



[Fig. 10]

Analisi statistica a più punti della regione Xp22.31

ANALISI BIOINFORMATICA

L'analisi bioinformatica della regione Xp.22.31 ha permesso di individuare i seguenti geni fortemente candidati per il ritardo mentale osservato nella famiglia:

NLGN4X, *VCXA*, *MIDI*, *CLCN4*.

NLGN4X

Questo gene codifica per un membro di una famiglia di proteine di superficie delle cellule neuronali, probabilmente coinvolta nelle interazioni cellula-cellula.

Membri di questa famiglia possono essere coinvolti nella formazione e nel rimodellamento delle sinapsi del sistema nervoso centrale. Mutazioni in *NLGN4X* sono state riscontrate in soggetti affetti da ritardo mentale e autismo di tipo 2 X-linked (AUTSX2).

AUTSX2 è un disturbo pervasivo dello sviluppo (PDD), caratterizzato da disabilità nell'interazione sociale e nella comunicazione che diventano limitate e stereotipate; la presenza di tali anomalie dello sviluppo compare dopo il 3° anno di età. Difetti in *NLGN4X* possono anche essere la causa della suscettibilità alla

sindrome di Asperger 2 di tipo X-linked. Questa sindrome è considerata una forma di autismo infantile.

VCXA

Questo gene è un inibitore dell'enzima DCP2 che rimuove il cap dell' mRNA , stabilizzandolo. Fukami et al. (2000) hanno dimostrato che in pazienti con intelligenza normale il gene *VCXA* non è deletato, mentre in pazienti che presentano ritardo mentale questo gene è deletato.

Con questi risultati si è ipotizzato che *VCXA* è necessario per lo sviluppo mentale.

MID1

Questo gene codifica per una proteina (midina) che appartiene alla famiglia dei regolatori trascrizionali (B-box family), che contengono un dominio di interazione proteina-proteina e sono stati implicati in processi di proliferazione e sviluppo cellulare.

Pinson et al. (2004) hanno messo in evidenza che l'espressione di *MID1* è elevata durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale, in particolare nel cervello.

CLCN4

Da uno studio del profilo di di differenti geni situati sul cromosoma X è risultato che *CLCN4* è associato a forme “ pure “ di ritardo mentale; (Chiaruzzi et al. Congresso SIGU 2010).

SEQUENZIAMENTO GENI CANDIDATI

L'analisi mutazionale delle regioni codificanti dei geni: *NLGN4X*, *VCXA*, *MID1*, *CLCN4* , non ha messo in evidenza alcuna alterazione.

DISCUSSIONE

Il ritardo mentale è una condizione di interrotto o incompleto sviluppo psichico, caratterizzato soprattutto da compromissione delle abilità cognitive, linguistiche, motorie, affettive e sociali che si manifestano durante il periodo evolutivo e che contribuiscono al livello globale di intelligenza.

L'incidenza del 3% nella popolazione umana, ne fa una patologia ad alta rilevanza clinica per l'impatto che essa ha sulla restante popolazione.

Il ritardo mentale dipende da difetti della formazione e della funzionalità delle sinapsi, le strutture di “ comunicazione “ tra cellule nervose. Perciò deficit nella formazione di queste strutture possono causare disturbi quali l'autismo, ritardo mentale e molti disturbi degenerativi. In questa tesi viene descritto lo studio effettuato su un'estesa famiglia sarda in cui sette componenti presentano un ritardo mentale di tipo X-linked, con l'obiettivo di identificare il gene responsabile della patologia. Poiché la ricerca di delezioni/duplicazioni dei geni MRX e delle regioni subtelomeriche attraverso l'analisi MLPA ha dato esito negativo, si è scelto di applicare l'analisi di linkage tra le varie strategie di identificazione dei geni malattia utilizzabili, in quanto la famiglia oggetto dello studio risulta essere sufficientemente estesa da avere un potere statistico significativo. Questa strategia si è rivelata efficace, in quanto ha permesso di individuare una regione del cromosoma X, situata nella regione Xp22.31 a circa 9,4 Mb dall'estremità telomerica del

braccio corto del cromosoma X in cui verosimilmente è presente il gene malattia. Dall'analisi bioinformatica sono stati individuati i geni: *NLGN4X*, *VCXA*, *MIDI1*, *CLCN4* selezionati sulla base di caratteristiche associate a ritardo mentale quali: espressione nei tessuti e funzioni delle proteine codificate. Questi geni sono stati sottoposti a sequenziamento diretto e hanno dato un esito negativo.

Poiché dall'analisi bioinformatica non sono stati individuati altri geni che potrebbero essere responsabili del Ritardo Mentale ,lo studio proseguirà attraverso l'analisi delle sequenze codificanti con il sequenziamento della regione Xp22.31 attraverso la tecnologia Next Generation effettuata dopo cattura delle regioni codificanti.

BIBLIOGRAFIA

- Chiurazzi P. , Pirozzi F. , Moscato U. , Van der Spek PJ. , Neri G.
, Profilo trascrizionale, brain ratio e ricerca di geni umani coinvolti nel Ritardo mentale; Abstracts S.I.G.U (2010)
- Gécz J. , Shoubbridge C. and Corbett M. **The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X;** Trends Genet. 2009 Jul; 25 (7): 308-16.Epub 2009 Jun 24. Review
- Chiurazzi, P., Schwartz, C. E., Gecz, J. and Neri, G. **XLMR genes: update 2007;** European Journal Of Human Genetics (2008) 1-13.
- Hilger, H., Ropers and Ben C. J. Hamel. **X-linked mental retardation;** Nature Publishing Group (2005) volume 6.
- Strachon, T. & Read, A. P. **Genetica umana e molecolare.** Utet libri.

- Leonard, H. & Wen, X. **The Epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium.** Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8, 117-134 (2002).
- Chelly, J. & Mandel, J. L. **Monogenic causes of X-linked mental retardation.** Nature Rev. Genet. 2, 669-680 (2001).
- Willernsen, R., Oostra, B. A., Bassell, G. J. & Dichtenberg, J. **The fragile X syndrome: from molecular genetics to neurobiology.** Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 10,60-67 (2004)
- Jamain, S. et al. **Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism.** Nature Genet. 34, 27-29 (2003).

- Scheiffelle, P., Fan, J., Fetter, R. & Serafini, T. **Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons.** *Cell* 101, 657-669 (2000).
- Chih, B., Afridi, S. K., Clark, L. & Scheiffelle, P. **Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins.** *Human Mol. Genet.* 13, 1471-1477 (2004)

